

INHIBITEURS DE PROTEASES POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIGESTIVES

La présente demande concerne des compositions et méthodes pour le traitement de pathologies intestinales. Elle concerne également des compositions et méthodes permettant de réguler la perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal. Les compositions et méthodes de l'invention reposent notamment sur l'utilisation d'inhibiteurs de protéases modulant l'ouverture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal. L'invention est utilisable pour le traitement préventif ou curatif de pathologies variées, telles que les troubles fonctionnels digestifs (TFD), plus particulièrement les troubles fonctionnels intestinaux (TFI), et notamment le syndrome de l'intestin irritable (SII encore appelé « Irritable Bowel Syndrome », IBS), les hyperalgésies et autres douleurs abdominales, etc., chez les mammifères, notamment les humains.

L'épithélium intestinal est le centre d'échanges très importants entre le milieu extérieur et l'organisme. Ces échanges peuvent s'effectuer soit à travers les cellules de l'épithélium, soit par des réseaux parallèles. Ainsi, le transport d'eau ou d'électrolytes, ou encore l'absorption de petites molécules (poids moléculaire généralement inférieur à 1000 Da environ) au niveau de la muqueuse gastrique, intestinale ou colique, s'effectue par voie transcellulaire, à travers les cellules épithéliales ou entérocytes. Par contre, l'absorption de grosses molécules et le passage d'antigènes, de toxines ou de cellules immunitaires se fait principalement par voie paracellulaire, au niveau de « jonctions serrées », qui sont disposées entre les cellules épithéliales.

Les jonctions serrées (« JS ») épithéliales (ou « *tight junction* », « TJ ») sont des structures de liaison entre les cellules bordant les épithéliums muqueux (tube digestif, poumons). Ces structures assurent et contrôlent le transport trans-épithélial paracellulaire, de l'extérieur vers la sous-muqueuse, de macromolécules

variées (allergènes, irritants, toxines, microorganismes). Ces structures permettent également la migration de cellules immunitaires (e.g., immunocytes) vers l'extérieur (tube digestif). Les jonctions serrées sont des structures souples constituées d'un assemblage complexe de protéines transmembranaires (occludines, claudines) et de protéines cytoplasmiques (protéines zona ocludens
5 ZO-1, ZO-2, ZO-3, protéines AF7, cinguline ou 7H6, etc.), qui sont associées à des éléments du cytosquelette (filaments de myosine, d'actine, etc.).

Parmi les troubles fonctionnels digestifs (TFD), on distingue les douleurs
10 abdominales sans trouble de l'élimination et les troubles fonctionnels intestinaux. Les douleurs abdominales sans trouble de l'élimination peuvent être provoquées par des allergies ou des intolérances alimentaires ou se manifester dans le cadre de la maladie cœliaque par exemple. Les troubles fonctionnels intestinaux affectent 15 à 20% de la population et se traduisent par des symptômes dyspeptiques et/ou
15 intestinaux pour lesquels aucune cause organique n'a jusqu'ici été identifiée et qui nécessitent un traitement spécifique. La caractéristique commune des troubles fonctionnels digestifs répondant aux critères de ROME est la douleur abdominale, présente en période postprandiale, qu'elle soit localisée en partie haute (dyspepsie) ou en partie basse de l'abdomen. Un trouble particulier qui affecte la partie basse
20 de l'abdomen est le Syndrome de l'Intestin Irritable (SII). La douleur des troubles fonctionnels intestinaux est le plus souvent soulagée par la défécation.

La physiopathologie des troubles fonctionnels digestifs (TFD) est mal connue mais les récentes investigations cliniques montrent l'existence chez ces patients d'un abaissement du seuil de perception douloureuse à la distension (hyperalgésie
25 viscérale) traduisant un état d'hypersensibilité digestive. Celui-ci semble relever en premier lieu d'une sensibilisation de mécanorécepteurs pariétaux par des médiateurs pro-inflammatoires. En effet l'existence de modifications de structure ou de densité de certaines cellules du système immunitaire au niveau de la sous-muqueuse en particulier du colon plaide en faveur d'une altération de l'équilibre
30 immunitaire avec la microflore résidente. Une densité accrue de mastocytes ou de

cellules entérochromaffines a été détectée dans des biopsies iléales et coliques chez des sujets atteints de SII. Cet état micro-inflammatoire digestif favorise la sensibilisation des terminaisons des neurones afférents primaires et cette sensibilisation pourrait conduire à une facilitation secondaire de la transmission, vers le cerveau, des messages à caractère nociceptif. Les études d'imagerie fonctionnelle indiquent en effet des modifications caractéristiques des aires de projection corticale de ces messages nerveux chez les sujets atteints de TFD.

Un tel processus de sensibilisation de l'intestin à la douleur peut être induit par des facteurs tels que le stress, des pathogènes, des allergènes, des enzymes de type trypsine ou tryptase par exemple, des sels biliaires, des xénobiotiques, des molécules chimiques de type glycérol, TNBS ou taurocholate par exemple et/ou des séquelles résultant d'une infection ou d'une opération chirurgicale. Toutefois, les mécanismes par lesquels ces facteurs sont capables d'initier le phénomène de sensibilisation ne sont pas clairement documentés *in vivo*. Lorsque des allergènes, des pathogènes et/ou des molécules chimiques par exemple sont absorbés, ils entrent en contact avec la paroi épithéliale intestinale qui empêche leur introduction dans l'organisme et leur mise en contact avec les cellules de l'immunité. Toutefois, pour qu'une sensibilité se développe, cela implique que certains allergènes, pathogènes et/ou molécule chimique sont capables de traverser cet épithélium pour interagir avec les cellules immunitaires. Les conditions dans lesquelles ce transfert est possible demeurent peu documentées *in vivo*. Ainsi, bien que certains rapports suggèrent, sur des cultures de cellules *in vitro*, un rôle des jonctions serrées dans ce processus, aucune démonstration n'a été apportée de l'implication de ces jonctions *in vivo* dans le développement d'une sensibilisation. De même, si Coremans et al. (Ital J Gastroenterol 1991 (8) S 1 :39-40) suggèrent un lien entre les sels biliaires, perfusés par voie intra-colique, et les douleurs abdominales d'un sujet présentant un intestin irritable, aucun résultat présenté n'établit de corrélation entre les jonctions serrées et un processus de sensibilisation à la douleur de l'épithélium intestinal.

Si la malabsorption des sels biliaires n'est observée que chez une faible proportion des sujets présentant un intestin irritable, des altérations de la perméabilité trans-épithéliale sont décrites chez les sujets développant un SII après gastro-entérite (SPILLER et al. Gut 2000 ; 47 : 804-11) mais sans qu'il soit
5 fait mention de modifications de la perméabilité paracellulaire laquelle n'est pas étudiée.

Une corrélation entre le syndrome de l'intestin irritable et la présence accrue de microorganismes au niveau de la sous-muqueuse a été mise en évidence au travers d'études expérimentales (AGA. 1999), de même qu'un lien a pu être constaté
10 entre les maladies inflammatoire chroniques de l'intestin ou les troubles fonctionnels intestinaux et des modifications du degré d'activation immunitaire (inflammation) de la paroi intestinale. Cependant, ces observations préliminaires n'ont pas été confirmées ou n'ont pas donné lieu à de nouvelles approches thérapeutiques.

15 La présente invention résulte de la mise en évidence de l'activation, par les protéases bactériennes libérées dans la lumière colique, des récepteurs PAR (proteinase-activated receptors), situés sur les membranes des cellules épithéliales, qui modulent l'ouverture des jonctions serrées, cette ouverture pouvant entraîner
20 un état d'hyperalgésie.

L'origine bactérienne des protéases mentionnées ci-dessus a été démontrée par le fait qu'un traitement oral de 10 jours par un cocktail d'antibiotiques détruisant la flore réduit la perméabilité des jonctions serrées, celle-ci étant restaurée par la perfusion intracolique d'un surnageant de contenu colique normal. Les inventeurs
25 ont par ailleurs démontré qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases perfusé dans la lumière colique réduisait la perméabilité paracellulaire colique et la sensibilité viscérale à la distension.

Le rôle *in vivo* des jonctions serrées de l'épithélium intestinal dans le processus de sensibilisation à la douleur a par ailleurs été mis en évidence dans la demande de
30 brevet WO 03/077893. L'"ouverture" des jonctions serrées de l'épithélium du

colon par différentes molécules ou par le stress entraîne une hyperalgésie spontanée ou une hypersensibilité à la distension (état caractéristique de l'IBS). Les résultats obtenus dans le cadre de cette invention ont établi pour la première fois et de façon surprenante que l'ouverture des jonctions serrées provoque un état
5 d'hyperalgésie retardé durable.

La présente invention découle de la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de pathologies intestinales, basées sur une modulation de la perméabilité para-cellulaire de l'épithélium intestinal à l'aide
10 d'inhibiteurs de protéases. En particulier, la présente invention propose une approche thérapeutique des pathologies intestinales basée sur l'emploi d'inhibiteurs de protéases permettant de contrôler l'ouverture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal. Ainsi, ces inhibiteurs de protéases permettent de moduler la tension du cytosquelette des cellules épithéliales intestinales ou de
15 réguler directement, de préférence diminuer, voire bloquer, l'ouverture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal. Cette approche permet donc de contrôler l'ouverture et la fermeture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal, sans nécessairement recourir à une synthèse protéique *de novo* et/ou à des dégradations protéiques et/ou structurales importantes au niveau de
20 l'épithélium. Cette stratégie permet de réguler la perméabilité de l'épithélium intestinal de manière spécifique, fine et réactive, et ainsi d'agir sur le transfert d'allergènes, de pathogènes et/ou de molécules chimiques vers les cellules de l'immunité. Cette stratégie est particulièrement adaptée à l'obtention d'un effet biologique rapide et contrôlable dans le temps (réversible).

25

A cet égard, les résultats présentés ci-dessous montrent qu'une substance susceptible de relâcher les jonctions serrées épithéliales (peptides activateurs du récepteur PAR-2 tels que le peptide SLIGRL) déclenche une hyperalgésie retard, une hypersensibilité à la distension et une augmentation de la perméabilité
30 colique. Les résultats présentés dans les exemples montrent également que la

suppression de cette augmentation de la perméabilité paracellulaire par un inhibiteur de protéases ou un mélange (cocktail) d'inhibiteurs de protéases supprime ou réduit cette hyperalgésie caractéristique des TFD et en particulier des SII.

5

Un premier objet de l'invention réside donc plus particulièrement dans l'utilisation d'au moins un inhibiteur de protéases, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif ou curatif des troubles fonctionnels digestifs. L'invention concerne également une telle utilisation pour la préparation
10 d'un médicament destiné au traitement préventif ou curatif de l'hyperalgésie survenant dans le cadre de pathologies intestinales. L'inhibiteur de protéase est de préférence un inhibiteur de protéases intracoliques.

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement préventif ou
15 curatif de pathologies intestinales caractérisées par un état d'hyperalgésie, comprenant l'administration à un sujet d'une quantité efficace d'au moins un inhibiteur de protéases.

Les inhibiteurs de protéases semblent agir en contrôlant l'ouverture des jonctions
20 serrées de l'épithélium intestinal. Ces inhibiteurs sont en particulier des inhibiteurs qui modulent la tension du cytosquelette de cellules épithéliales intestinales ou des inhibiteurs qui diminuent, voire bloquent, l'ouverture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal.

L'invention repose ainsi sur l'utilisation d'inhibiteurs de protéases modulant la
25 tension et l'état de contraction du cytosquelette des cellules de l'épithélium intestinal ou empêchant une ouverture trop importante des jonctions serrées qui aboutit à une hyperalgésie ou à une hypersensibilité à la distension de l'intestin.

Les protéines composant les jonctions serrées sont associées au cytosquelette des
30 cellules qu'elles relient. Il est proposé dans le cadre de l'invention que la tension

du cytosquelette ou l'ouverture des jonctions serrées puisse être modulée chez des sujets atteints de maladies ou désordres intestinaux pour agir de manière non destructrice et transitoire sur la perméabilité de leur épithélium intestinal. Ainsi, la contraction du cytosquelette doit favoriser l'ouverture des jonctions serrées, tandis qu'un relâchement du cytosquelette (ou qu'une inhibition de la contraction) doit favoriser la fermeture des jonctions. Il est possible également de moduler directement les jonctions serrées, en particulier sur les protéines les constituant, en diminuant ou en bloquant leur ouverture.

- On utilise donc préférentiellement dans le cadre de l'invention des inhibiteurs de protéases qui modulent la contraction du cytosquelette de cellules épithéliales intestinales (notamment humaines) ou qui contrôlent l'ouverture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal (notamment humain). Selon la condition à traiter, on utilise des inhibiteurs de protéases qui inhibent la contraction du cytosquelette de cellules épithéliales intestinales, ou qui activent ou favorisent celle-ci

Un inhibiteur de protéase est considéré comme modulant la tension du cytosquelette lorsqu'il module l'ouverture des jonctions serrées. Un effet inhibiteur de la contraction ou de la tension des filaments d'actine et/ou de myosine ne doit pas nécessairement être complet ou total, mais il suffit qu'il diminue la contraction ou la tension du cytosquelette suffisamment pour réduire l'ouverture des jonctions serrées.

La réduction de l'ouverture des jonctions serrées correspond préférentiellement à une diminution minimale d'environ 25%, avantageusement d'environ 30%, de façon encore plus préférée d'environ 50% de la perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal. La perméabilité paracellulaire peut être mesurée à l'aide d'un marqueur tel que le ^{51}Cr -EDTA lequel après son passage dans le sang est mesuré dans les urines pendant 24 heures (cf. : exemple 1).

Les inhibiteurs de protéases utilisés sont de préférence les inhibiteurs agissant sur les sérine-protéases et/ou les métalloprotéases. De tels inhibiteurs sont particulièrement actifs pour réduire l'action des protéases bactériennes sur la perméabilité colique.

- 5 Les inhibiteurs de protéases utilisés sont avantageusement des molécules, qui peuvent être sous forme isolée ou sous forme de cocktail, de combinaison, d'extraits biologiques, etc. Ces molécules peuvent être synthétiques, semi-synthétiques ou biologiques, notamment d'origine animale, virale, végétale ou bactérienne.

10

- On peut notamment citer comme inhibiteurs de proteases, les inhibiteurs sélectifs ou non sélectifs de serine-proteases [serpine et ses dérivés, Aprotinine, N-tosyl-L-phenylalanyl chlorométhyle cétone (TPCK), dichloroisocoumarine, nexin-1, AEBSF-HCl, Antipain, benzamidine, Leupeptine, TLCK, Ovomucoide, fluorure de phénylméthyle sulfonyl (PMSF), PEFABLOC® et les extraits de soja] et de
- 15 de métallo-protéases (Amastatine, Arphamenine, Bestatin, Diprotin A, Phosphoramidon) ainsi que les molécules non-spécifiques utilisées comme anti-viraux (amprenavir, indinavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir et atazanavir).

20

Les inhibiteurs de protéases peuvent être utilisés seuls ou en combinaisons et/ou en association avec d'autres agents actifs, comme par exemple d'autres substances actives utilisées dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable.

- 25 Les inhibiteurs de protéases sont ainsi éventuellement utilisés en combinaison et/ou en association avec des composés qui diminuent ou bloquent l'ouverture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal, notamment par modulation de la tension du cytosquelette, ou qui augmentent l'ouverture de celles-ci.

- L'activité de ces composés peut être directe ou indirecte, c'est-à-dire dirigée sur
- 30 les constituants mêmes du cytosquelette ou sur des régulateurs de sa tension. Bien

que non limitatif, on préfère les composés agissant de manière directe sur la tension du cytosquelette. En outre, on préfère également des composés présentant une activité sélective sur la tension du cytosquelette, c'est-à-dire typiquement des composés qui n'affectent pas directement la structure des protéines constitutives des jonctions serrées. De même, l'inhibiteur de protéases selon l'invention, n'affecte de préférence pas directement la structure des protéines constitutives des jonctions serrées.

Différents types de composés peuvent être utilisés en combinaison avec des inhibiteurs de protéases dans le cadre de la présente demande. Ainsi, au sens de l'invention, le terme « composé » doit être pris dans un sens large, c'est-à-dire comme désignant tout agent, substance, composition, condition, traitement ou procédé permettant de moduler l'ouverture des jonctions serrées de l'épithélium intestinal. Il s'agit avantageusement d'un agent (e.g., d'une molécule) ou d'une combinaison ou association d'agents. Des exemples de tels composés sont indiqués dans la demande de brevet international n° WO 03/077893. Il s'agit notamment d'inhibiteurs de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK). Un exemple particulier d'inhibiteurs sélectif de MLCK est le composé ML-7 {1-(5-iodonaphtalène-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine} (Makishima M. et al. FEBS Lett. 1991; 287:175). D'autres exemples de tels inhibiteurs sont notamment le composé ML-9 (Wilson DP. et al. J Biol Chem. 2001;13: 165) ou d'autres non sélectifs: Wortmannin (Warashina A. Life Sci 2000;13: 2587-93), H-7 (Piao Zf et al. Mol Cell Biol Res Commun 2001;4: 307-12) et KT 7692 (Warashina A. Life Sci 2000;13: 2587-93). D'autres cibles agissant sur la tension du cytosquelette de composés utilisables en combinaison avec des inhibiteurs de protéases sont notamment les protéines de liaison à la myosine, telles que par exemple la cinguline, ou les molécules de jonction, telles que la cadherine-E, la catenine- α ou les desmosomes. La modulation de l'activité ou de l'expression de ces protéines permet de réguler la tension du cytosquelette, dans le cadre de la présente invention. On peut également utiliser des inhibiteurs de protéases combinés à des

composés inhibiteurs de la synthèse de protéines ou autres molécules assurant la liaison entre les protéines du cytosquelette et les protéines des jonctions serrées. Il est également possible d'utiliser dans le cadre de l'invention des inhibiteurs de kinases activées par les mitogènes (MAPKK), notamment de la kinase MEK1 ou de la kinase-PI3, tels que les composés PD098,059 {2-(Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one} (Alessi et al. J.Biol.Chem.1995; 270, 27589) ou LY294002 {2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one} (Vlahos et al.J.Biol.Chem 1994;269: 5241). D'autres molécules utilisables pour réguler, de manière indirecte, la tension du cytosquelette, sont des facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance hépatique (HGF), le facteur de croissance endothélial (EGF) ou certaines cytokines susceptibles d'être libérées par les immunocytes, telles que les interleukines-1, -4, -13, ou les facteurs tels que IGF-1 ou l'interféron gamma. Une autre approche permettant de réguler de manière indirecte la tension du cytosquelette repose sur l'utilisation du peptide GLP2 (« glucagon-like peptide 2 ») ou de ses dérivés, qui peuvent modifier la perméabilité de l'épithélium intestinal par un effet indirect sur la contraction du cytosquelette. De même, certaines molécules agissant sur des récepteurs situés au pôle apical des cellules épithéliales (ex: récepteurs aux protéinases; PAR-2) peuvent agir indirectement sur le cytosquelette. D'autres agents actifs sont par exemple les composés anti-cholinergiques, les prokinétiques, les anti-diarrhéiques, les modificateurs de la motricité digestive, etc. Ces différents agents peuvent être utilisés en combinaison thérapeutique, et administrés sous forme séparée, combinée, étalée dans le temps ou concomitante.

Un autre objet de l'invention réside ainsi dans un produit, un cocktail ou une association pharmaceutique comprenant au moins un inhibiteur de protéases et au moins un autre agent actif sélectionné parmi les composés anti-cholinergiques, les substances prokinétiques, les anti-diarrhéiques, les laxatifs ou les modificateurs de la motricité, de la viscéro-sensibilité (ou de la sensibilité digestive), en vue d'une utilisation combinée, séparée ou espacée dans le temps.

La présente invention peut être utilisée pour le traitement ou la prise en charge de pathologies ou désordres du système digestif caractérisés par un état d'hyperalgésie, notamment de troubles fonctionnels intestinaux, de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), d'intolérances alimentaires (allergies, conditionnements, etc.) caractérisées par une douleur viscérale chronique. Elle est particulièrement adaptée au traitement préventif ou curatif des hyperalgésies et en particulier du syndrome de l'intestin irritable (SII) quelque soit sa forme (constipation, diarrhée ou une combinaison des deux), mais également des douleurs viscérales chroniques n'entrant pas dans le cadre du SII, telles que les douleurs abdominales fonctionnelles sans trouble de l'élimination fécale (FAPS : Functional Abdominal Pain) et les douleurs liées aux intolérances alimentaires et à la maladie cœliaque. Elle est utilisable de manière préventive chez des sujets présentant des prédispositions ou une sensibilité à ce type de désordres, ou de manière curative, par exemple lors de crises ou sur des périodes plus longues. Les compositions et méthodes de l'invention permettent de réduire la souffrance des sujets, d'atténuer les symptômes ou la cause de ces désordres.

La présente invention démontre en effet de façon surprenante que la suppression de l'augmentation de la perméabilité paracellulaire associée à l'activation des récepteurs PAR (par exemple le récepteur PAR-2) empêche l'apparition de l'hyperalgie viscérale.

Un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de protéases tel que défini ci-avant pour la préparation d'un médicament destiné à contrôler, notamment à réduire, la perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal chez des sujets atteints de maladies intestinales caractérisées par un état d'hyperalgésie, notamment de maladies inflammatoires chroniques caractérisées par une accumulation, dans la couche sous-muqueuse, d'immunocytes (par exemple de mastocytes et/ou de cellules entérochromaffines), par une sensibilité

accrue des mécanorécepteurs pariétaux et éventuellement par une infiltration de bactéries du colon dans la couche sous-muqueuse, par exemple les hyperalgésies et notamment le syndrome de l'intestin irritable.

5 Un autre objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de protéases tel que défini ci-avant pour la préparation d'un médicament destiné à réduire la sensibilisation aux allergènes, pathogènes et/ou molécules chimiques chez des sujets atteints ou sensibles aux maladies fonctionnelles intestinales, notamment aux affections intestinales caractérisées par une accumulation, dans la
10 couche sous-muqueuse, d'immunocytes, notamment par exemple de mastocytes et/ou de cellules entérochromaffines, par une sensibilité accrue des mécanorécepteurs pariétaux et éventuellement par une infiltration de bactéries du colon dans la couche sous-muqueuse, par exemple les hyperalgésies et notamment le syndrome de l'intestin irritable.

15

Un autre objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de protéases tel que défini ci-avant pour la préparation d'un médicament destiné à réduire la migration transépithéliale d'immunocytes et l'accumulation d'immunocytes dans la couche sous-muqueuse de sujets atteints d'une pathologie
20 fonctionnelle intestinale, notamment d'une affection intestinale induisant une hyperalgésie viscérale, par exemple le syndrome de l'intestin irritable, caractérisée par une accumulation, dans la couche sous-muqueuse d'immunocytes, notamment de mastocytes et/ou de cellules entérochromaffines, par une sensibilité accrue des mécanorécepteurs pariétaux et éventuellement par une infiltration de bactéries du
25 colon dans la couche sous-muqueuse.

L'invention est également relative à des méthodes de traitement des conditions indiquées ci-dessus, comprenant l'administration à un sujet atteint d'une pathologie intestinale ou sensible aux pathologies intestinales, d'un inhibiteur de
30 protéases ou traitement tel que défini ci-avant. De préférence, l'inhibiteur de

protéases ou le traitement est administré dans une dose efficace pour réduire la perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal et/ou pour réduire la sensibilité à la douleur et/ou pour réduire la migration transépithéliale d'allergènes, de toxines, d'irritants ou de microorganismes et ainsi l'accumulation
5 d'immunocytes dans la couche sous-muqueuse de l'intestin.

L'inhibiteur de protéases peut être administré par différentes voies et sous différentes formes. Ainsi, l'inhibiteur de protéases peut être sous forme liquide ou solide, typiquement sous forme de comprimé, gélule, capsule, ampoule ou soluté
10 buvable, solution injectable, etc. On préfère des composés formulés sous une forme administrable par voie orale (solutés buvables, comprimés, ampoules, gélule, capsule, sirops, etc.) ou rectale (suppositoire). Le conditionnement en capsule ou gélule libérant son contenu par digestion microbienne dans le colon est particulièrement préféré, lorsque cela est possible. Bien entendu, d'autres formes
15 d'administration sont possibles, comme des injections (intrapéritonéale, intradermique, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intra-artérielle, etc.), des pâtes, gels, etc.

Un autre objet de l'invention réside dans une composition pharmaceutique
20 comprenant au moins un inhibiteur de protéases et un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique, ladite composition étant formulée préférentiellement pour une administration par voie orale ou rectale. De préférence, la composition se présente sous forme de suppositoire, ou sous forme de capsule ou gélule libérant son contenu par digestion microbienne dans le colon.

25

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Influence de doses croissantes d'un peptide activateur des récepteurs PAR-2 (SLIGRL) sur l'absorption d'une macromolécule (^{51}Cr -EDTA) évaluée par le pourcentage retrouvé au niveau des urines collectées pendant 24h chez le rat.

Figure 2 : Perméabilité paracellulaire colique chez la souris. Influence de différents inhibiteurs de protéases bactériennes (moyenne \pm SD ; n=12) :

Cocktail d'inhibiteurs de protéase (1/2 cachet)

10 Cystéine protéase inhibiteur (100 $\mu\text{g/ml}$)

Sérine protéase inhibiteur (100 et 500 $\mu\text{g/ml}$)

Matrice Metallo Protéase inhibiteurs (100 $\mu\text{g/ml}$)

Figure 3 : Modifications de la perméabilité paracellulaire colique engendrée par la perfusion intraluminale de trypsine et de surnageant de contenu colique chez la souris normale (témoin) et après un traitement de 10 jours par un cocktail d'antibiotiques (Néomycine : 2mk/kg/j + ampicilline : 1mg/kg/j) administré par voie orale chez la souris (moyenne \pm SD ; n=12).

20 Figure 4 : Diminution de la sensibilité rectale à la distension par la perfusion intracolique d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases chez le rat (moyenne \pm écart-type ; n=8).

Figure 5 : Influence de la perfusion intracolique de trypsine sur la sensibilité rectale à la distension chez le rat (moyenne \pm ESM ; n=8).

EXEMPLES

Exemple 1 : Réduction de l'hyperalgésie rectale à l'aide d'un bloqueur des jonctions serrées.

L'épithélium intestinal possède des structures de liaison des cellules épithéliales qui assurent un passage contrôlé des immunocytes dans la couche sous-muqueuse de l'intestin. Cet exemple montre que certaines molécules connues pour leur effet d'augmentation de la perméabilité paracellulaire au niveau intestinal tel que le SLIGRL favorisent l'accumulation d'immunocytes dans la sous-muqueuse intestinale (mastocytes, cellules entérochromaffines) et que cet effet peut être prévenu (e.g., inhibé, réduit) par un traitement intracolique impliquant un bloqueur des jonctions serrées.

10

Pour réaliser cette étude, six lots de 8 rats mâles Wistar (200-250 g) ont été utilisés. Les animaux ont été munis d'un cathéter intracolique placé à demeure au niveau du côlon proximal (à 3 cm de la jonction caeco-colique). Au cours de ces essais, 4 lots de rats ont été perfusés par voie intracolique durant 10h avec une solution de ^{51}Cr - EDTA (0.5 $\mu\text{C}/\text{h}$). Les animaux étant placés dans des cages individuelles, l'urine totale de 24h a été collectée et la mesure de sa radioactivité a permis d'évaluer la perméabilité de la muqueuse colique au ^{51}Cr - EDTA. Des doses croissantes d'un peptide activateur du PAR-2 (SLIGRL) ont été injectées dans la lumière colique (lots 2, 3 et 4) au temps $t = 0$ (début de perfusion du ^{51}Cr - EDTA) aux doses de 0,05, 0,2 et 0,5 mg/rat, le lot 1 recevant le solvant. La figure n°1 montre l'augmentation dose-dépendante de la perméabilité au ^{51}Cr -EDTA induite par le SLIGRL montrant son effet d'augmentation de la perméabilité paracellulaire.

25

Exemple 2 : Perméabilité paracellulaire colique chez la souris. Influence de différents inhibiteurs de protéases bactériennes.

Six lots de 10 souris Swiss mâles (25-30 g) ont été utilisés pour cette étude. Les animaux ont été perfusés pendant 5 heures par voie intracolique (250 $\mu\text{l}/\text{h}$) à

30

l'aide d'un cathéter introduit par voie rectale et fixé à la base de la queue, avec les différentes solutions d'inhibiteurs de protéases et perfusion ajoutée de ^{51}Cr -EDTA de 3 à 5 heures (Fig.2). A t=5heures, les animaux sont abattus et après prélèvement du colon, la radioactivité totale retrouvée dans le corps témoigne de la perméabilité paracellulaire. Celle-ci apparaît significativement réduite après perfusion du cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche ref : 1 873 580, EDTA-free), d'un inhibiteur de sérine-protéases (Aprotinin Sigma A1153) et d'un inhibiteur non-spécifique de matricemétallo-protéases (galardin Sigma : M5939.) (Fig.2)

Exemple 3 : Modifications de la perméabilité paracellulaire colique chez la souris engendrée par la perfusion intraluminaire de trypsine et de surnageant de contenu colique et après un traitement par un cocktail d'antibiotiques.

Des lots de 10 souris mâle Swiss (Janvier- France) pesant 25-30g ont été utilisés dans cette expérience. En condition basale, les effets sur la perméabilité paracellulaire colique de la perfusion intracolique de trypsine (50 μl , 600U) et de surnageant de contenu colique prélevé sur des souris contrôle perfusées par voie intracolique (250 $\mu\text{l/h}$) pendant 3 heures un jour (J1) ou 2 jours consécutifs (J2) ont été mesurés. Les mêmes perfusions ont ensuite été répétées après 12 jours d'un traitement oral par un cocktail d'antibiotiques (néomycine : 2mg/kg/j+ ampicilline : 1mg/kg/j). Les résultats montrent 1) que le traitement aux antibiotiques diminue la perméabilité colique, 2) que l'augmentation de la perméabilité induite par la trypsine disparaît après traitement antibiotique induisant probablement une disparition des récepteurs épithéliaux aux protéases et 3) que chez ces animaux, la perfusion de surnageant colique augmente cette perméabilité au deuxième jour (Fig.3).

Exemple 4 : Diminution de la sensibilité rectale à la distension par la perfusion intracolique d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases chez le rat.

Dans cette série d'essais, 3 lots de 8 rats mâles Wistar (250-300 g) ont été soumis à un protocole de distension rectale de volumes croissants (0,4 ml) de 0 à 1,6 ml réalisées à l'aide d'une sonde à embolectomie (FORGATY®). Les animaux ont
5 été équipés au préalable d'électrodes implantées dans les muscles striés de l'abdomen permettant l'enregistrement électromyographiques des crampes abdominales reconnues comme un critère de douleur.

Au temps $t=0$ les animaux ont reçu, par voie intracolique, une perfusion pendant 12 heures du cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche réf.: 1 873 580) (2
10 cachets – 0.5ml/h) ou de son solvant NaCl 0.9%. A la fin de la perfusion, les animaux sont soumis au protocole de distension rectale. Par rapport au lot témoin, la perfusion d'inhibiteurs de protéases provoque une diminution significative de la réponse abdominale pour les volumes de distension de 0,8, 1,2 et 1,6 ml (Fig. 4) montrant ainsi que les protéases libérées par la microflore dans la lumière colique
15 participent à la détermination de l'état basal de sensibilité rectocolique à la distension (Fig.4).

Exemple 5 : Influence de la perfusion intracolique de trypsine sur la sensibilité rectale à la distension chez le rat

20 Dans cette série d'essais 2 lots de 8 rats mâles Wistar (250-300 g) ont été soumis à un protocole de distension rectale suivant des étapes croissantes (0,4 ml) de 0 à 1,6 ml réalisées à l'aide d'une sonde à embolectomie (FORGATY®). Les animaux ont été équipés au préalable d'électrodes implantées dans les muscles
25 striés de l'abdomen permettant l'enregistrement électromyographiques des crampes abdominales reconnues comme un critère de douleur.

Au temps $t=0$, les animaux ont reçus, par voie intracolique, la trypsine (400 unités) un activateur spécifique des récepteurs PAR-2, à la dose de 20 unités (lot 1) ou son solvant (lot 2). Au temps $t = 10h$, après l'administration intracolique de
30 trypsine, les animaux sont soumis au protocole de distension rectale. Par rapport

au lot témoin, la trypsine provoque une augmentation significative de la réponse abdominale pour les volumes de distension de 0,8, 1,2 et 1,6 ml (Fig. 5) montrant ainsi qu'une augmentation de concentration intracolique en protéases augmente la sensibilité colique à la distension.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un inhibiteur de protéases, pour la préparation d'un
5 médicament destiné au traitement préventif ou curatif des troubles fonctionnels digestifs (TFD).
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'inhibiteur de protéases est un inhibiteur de protéase intracolique.
- 10 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'inhibiteur est un inhibiteur de sérine-protéases ou un inhibiteur de métalloprotéinases.
4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'inhibiteur de
15 sérine-protéases est choisi parmi la serpine et ses dérivés, l'Aprotinine, la N-tosyl-L-phenylalanyl chlorométhyle cétone, la dichloroisocoumarine, la nexin-1, le AEBSF-HCl, l'Antipain, la benzamidine, la Leupeptine, le TLCK, l'Ovomucoïde, le fluorure de phénylméthyle sulfonyl, le PEFABLOC® et les extraits de soja.
- 20 5. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'inhibiteur de métalloprotéinases est choisi parmi l'Amastatine, l'Arphamenine, la Bestatin, la Diprotin A et le Phosphoramidon.
6. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'inhibiteur de
25 protéases est choisi parmi l'amprenavir, l'indinavir, le lopinavir, le ritonavir, le saquinavir, le nelfinavir et l'atazanavir.
7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'un médicament destiné à contrôler la perméabilité paracellulaire de

l'épithélium intestinal chez des sujets atteints de maladies fonctionnelles intestinales caractérisées par un état d'hyperalgésie.

5 8. Utilisation selon la revendication 7, pour la préparation d'un médicament destiné à réduire la perméabilité paracellulaire de l'épithélium intestinal chez des sujets atteints de maladies fonctionnelles intestinales caractérisées par un état d'hyperalgésie.

10 9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'un médicament destiné à réduire la sensibilité à la douleur chez des sujets atteints ou sensibles aux maladies fonctionnelles intestinales caractérisées par un état d'hyperalgésie.

15 10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif ou curatif des troubles fonctionnels intestinaux (TFI).

20 11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que les troubles fonctionnels intestinaux sont choisis parmi le syndrome de l'intestin irritable (SII), les douleurs abdominales fonctionnelles sans trouble de l'élimination fécale et les douleurs liées aux intolérances alimentaires.

12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'inhibiteur est administré par voie orale ou rectale.

25

13. Utilisation d'au moins un inhibiteur de protéases, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif ou curatif de l'hyperalgésie survenant dans le cadre de pathologies intestinales.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que l'inhibiteur de protéases est tel que défini à l'une des revendications 2, 3, 4, 5 et 6.

5 15. Produit pharmaceutique comprenant au moins un inhibiteur de protéases et au moins un autre agent actif sélectionné parmi les composés anti-cholinergiques, les prokinétiques, les anti-diarrhéiques, les laxatifs, les modificateurs de la motricité ou de la viscéro-sensibilité, en vue d'une utilisation combinée, séparée ou espacée dans le temps.

10 16. Produit selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'inhibiteur de protéase est choisi parmi un inhibiteur de sérine-protéases et un inhibiteur de métallo-protéases.

15 17. Produit pharmaceutique selon l'une des revendications 15 ou 16, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'une capsule ou d'une gélule libérant son contenu par digestion microbienne dans le colon.

1/5

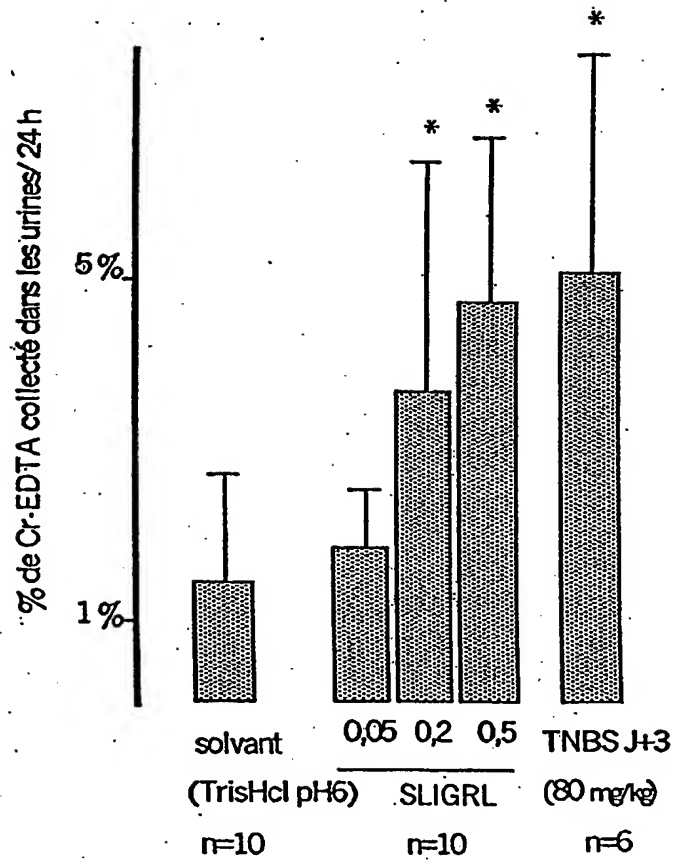


Figure 1.

2/5

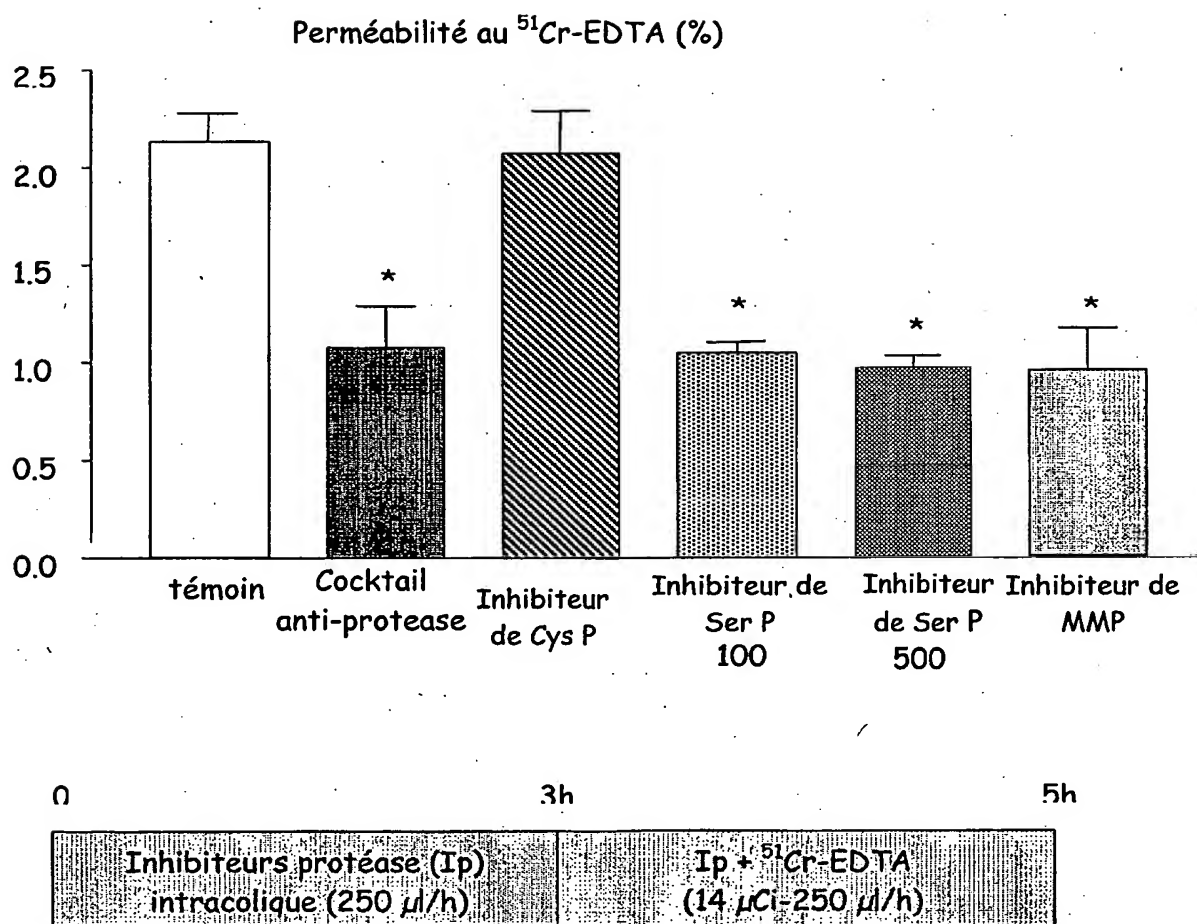
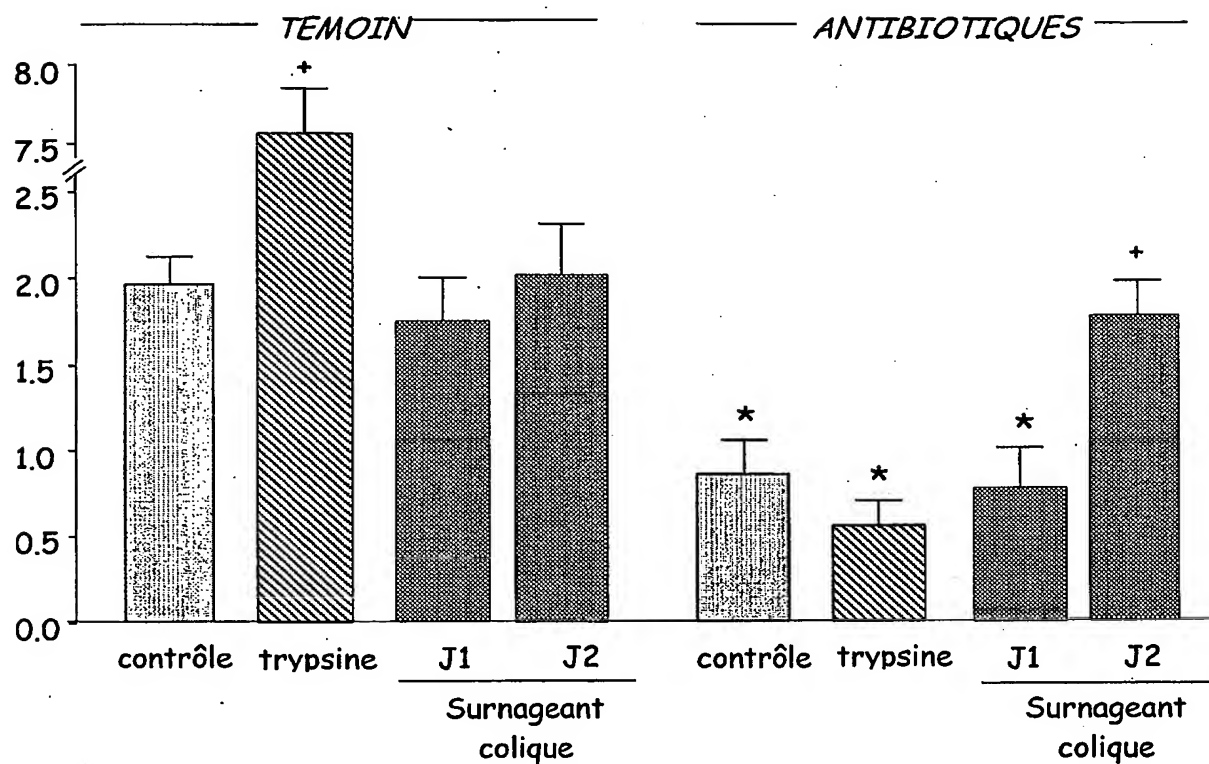


Figure 2

3/5

Perméabilité paracellulaire colique (% ^{51}Cr -EDTA)

*, valeurs significativement différentes des valeurs « Témoin » correspondantes

+, valeurs significativement différentes des valeurs « Contrôle » correspondantes ($p < 0.05$)

Figure 3

4/5

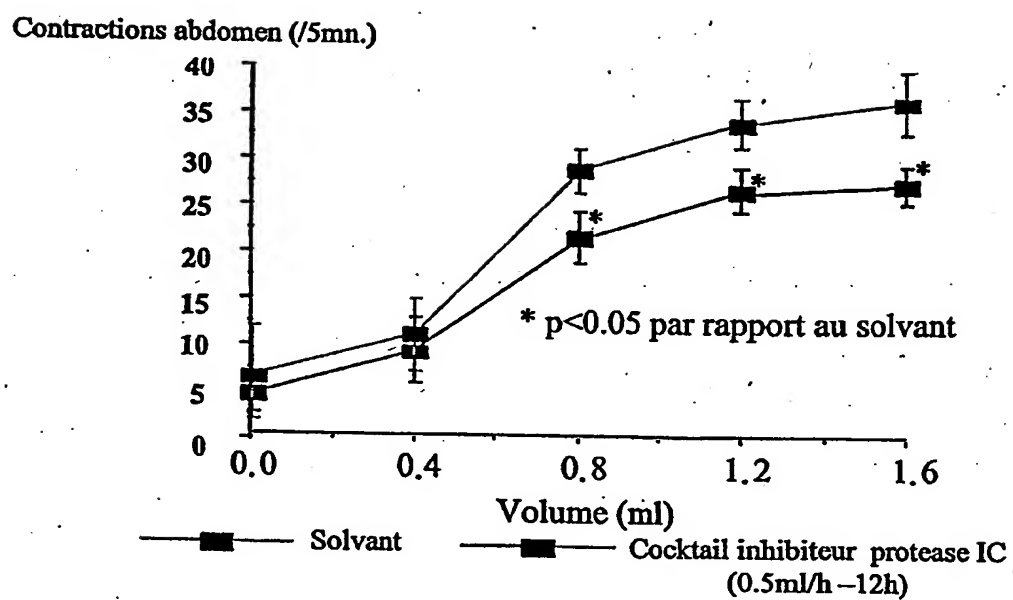
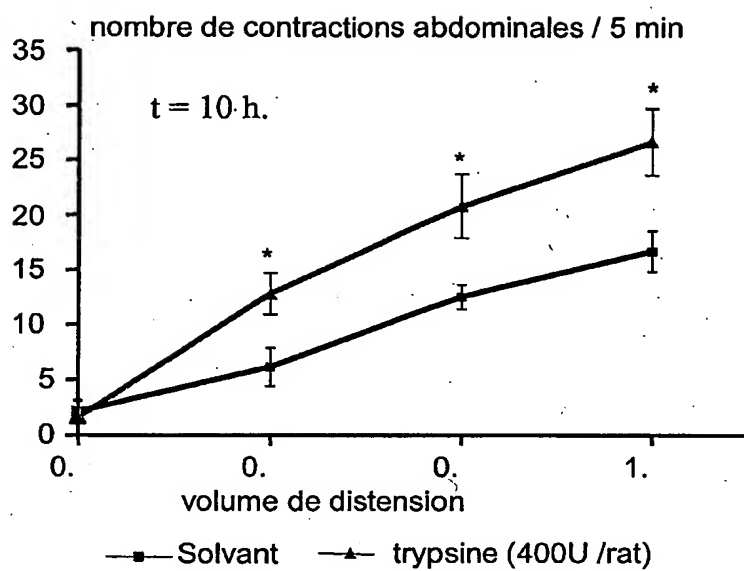


Figure 4

5/5



* $p < 0.05$ significativement différent des valeurs "solvant"

Figure 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/000108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/55 A61P1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 958 833 A (UNIV ERASMUS) 24 November 1999 (1999-11-24)	1-4,7-9, 12-14
Y	page 2, paragraph 6 page 3, paragraph 18 - page 4, paragraph 19	15-17
X	US 2003/138423 A1 (ARDITI MOSHE ET AL) 24 July 2003 (2003-07-24)	1,2,6-14
Y	claims 2,17	15-17
X	WO 02/070468 A (MAKOVEC FRANCESCO ; ROTTA RES LAB S P A (IT); ARTUSI ROBERTO (IT); ZAN) 12 September 2002 (2002-09-12) page 2, paragraph 3; claims 1,11	1-3,7-14
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 June 2005

Date of mailing of the international search report

27/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bochelen, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/000108

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99/55323 A (DRAY ANDREW ; ASGHAR AZIZ (GB); KING ANNE (GB); ASTRA AB (SE); CABERO) 4 November 1999 (1999-11-04) claim 1	1-17
A	WO 03/077893 A (RYTEK ; BUENO LIONEL (FR)) 25 September 2003 (2003-09-25) the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/000108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0958833 A	24-11-1999	EP 0958833 A1	24-11-1999
		AT 293455 T	15-05-2005
		AU 768615 B2	18-12-2003
		AU 4064299 A	06-12-1999
		CA 2332370 A1	25-11-1999
		DE 69924842 D1	25-05-2005
		EP 1079853 A1	07-03-2001
		JP 2002515454 T	28-05-2002
		WO 9959623 A1	25-11-1999
		NZ 508406 A	29-08-2003
		US 6723354 B1	20-04-2004
		US 2004166183 A1	26-08-2004
US 2003138423 A1	24-07-2003	AU 2002346594 A1	30-06-2003
		EP 1453504 A1	08-09-2004
		JP 2005511767 T	28-04-2005
		WO 03051361 A1	26-06-2003
WO 02070468 A	12-09-2002	IT T020010110 A1	08-08-2002
		CA 2437109 A1	12-09-2002
		WO 02070468 A2	12-09-2002
		EP 1363875 A2	26-11-2003
		JP 2004531489 T	14-10-2004
		US 2004110801 A1	10-06-2004
WO 9955323 A	04-11-1999	AT 271861 T	15-08-2004
		AT 270545 T	15-07-2004
		AU 4179399 A	16-11-1999
		AU 760783 B2	22-05-2003
		AU 4302499 A	16-11-1999
		BR 9909971 A	26-12-2000
		CA 2329328 A1	04-11-1999
		CN 1307471 A	08-08-2001
		DE 69918541 D1	12-08-2004
		DE 69918972 D1	02-09-2004
		DK 1073431 T3	04-10-2004
		EP 1073430 A1	07-02-2001
		EP 1073431 A1	07-02-2001
		ES 2221753 T3	01-01-2005
		HK 1033876 A1	04-03-2005
		JP 2002512955 T	08-05-2002
		JP 2002512956 T	08-05-2002
		NO 20005386 A	26-10-2000
		NZ 507436 A	26-09-2003
		WO 9955322 A1	04-11-1999
		WO 9955323 A1	04-11-1999
		SI 1073431 T1	31-12-2004
		TW 570793 B	11-01-2004
		US 6221887 B1	24-04-2001
WO 03077893 A	25-09-2003	FR 2837103 A1	19-09-2003
		FR 2844201 A1	12-03-2004
		AU 2003244690 A1	29-09-2003
		EP 1485074 A2	15-12-2004
		WO 03077893 A2	25-09-2003
		US 2005054577 A1	10-03-2005